

**PENGARUH IRRADIASI LASER TERHADAP INTENSITAS FLUORESENSI  
DARI EKSPERIMEN PENGAMATAN KALSIUM ( $\text{Ca}^{2+}$ )  
DALAM OOSIT *IMMATURE* KAMBING YANG DIBERI INDIKATOR FLUO-3  
DENGAN MENGGUNAKAN *CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPE (CLSM)***

**Siti Zulkhijah Rohmaten<sup>1)</sup>, Ir. DJ. Djoko HS, M.Phil., Ph.D<sup>2)</sup>, dan Drs Unggul P. Juswono,  
M.Sc<sup>3)</sup>, Hari Soepriandono S.Si., M.Si<sup>4)</sup>**

<sup>1)</sup> Mahasiswa Jurusan Fisika, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang

<sup>2)</sup> Dosen Jurusan Fisika, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang

<sup>3)</sup> Dosen Jurusan Fisika, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang

<sup>4)</sup> Mahasiswa S3 Jurusan Biologi, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya Malang

**Abstrak**

*Osilasi kalsium yang terjadi pada oosit yang telah diberi indikator biasanya diamati dengan menggunakan laser fluorescence microscope. Pada mikroskop ini osilasi kalsium dapat terlihat sebagai peristiwa transfer energi yaitu hasil pemendaran warna dari penembakan energi oleh laser ke oosit yang berindikator fluo-3. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi terjadinya peristiwa Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) dan untuk mengetahui pengaruh dari perubahan pengaturan prosentase laser yang di tembakkan oleh sumber laser yang digunakan sebagai sumber eksitasi pada eksperimen pengamatan  $\text{Ca}^{2+}$  dalam oosit kambing dengan indikator fluo-3. Pada penelitian ini menggunakan confocal microscope laser scanning dengan sumber laser Argon 488 nm, laser HeNe G 543nm dan laser HeNe R 633nm. Prosentase laser pada program microscope diatur berubah – ubah tiap lasernya. Analisa terjadinya transfer energi dilakukan dengan membuat grafik puncak - puncak intensitas yang tertangkap oleh channel-channel pada microscope yang membentuk grafik transfer energi. Dari hasil penelitian ini didapatkan bahwa ketika laser yang dinyalakan hanya 1 dengan prosentase yang maksimal, banyaknya kemungkinan transfer energi tidak dapat saling dibandingkan atau data yang didapat random. Sehingga dapat disimpulkan bahwa belum terlihat adanya pengaruh dari dirubahnya prosentase setiap laser pada pengamatan  $\text{Ca}^{2+}$  dalam oosit kambing dengan indikator fluo-3.*

**Kata Kunci : Kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), Oosit Kambing, Indikator Fluo-3, CLSM, FRET.**

**PENDAHULUAN**

Oosit dikenal sebagai sel kelamin betina yang belum matang (Ismudiono, 2010). Oosit merupakan salah satu syarat utama untuk menunjang terjadinya proses reproduksi. Pada oosit saat proses pematangan atau fertilisasi memiliki perbedaan konsentrasi. Pada oosit muda, Kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) akan menyebar dan bergerak keluar masuk sel secara bebas, Sedangkan pada oosit dewasa Kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) akan berkumpul pada membran terluar pada zona pelucida dan akan membentuk lapisan di sebelah dalam membran vitelin, perbedaan konsentrasi Kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ini disebut perubahan osilasi Kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Kalsium

pada proses reproduksi mamalia (kambing) berperan sebagai sinyal intraseluler yang bertanggung jawab untuk mengawali proses aktivasi, fertilisasi secara alami maupun buatan (Sun, 1992). Osilasi kalsium terjadi setiap 2-3 menit pada oosit imatur yang dihasilkan dari folikel antral (Carrol, 1994). Osilasi kalsium pada oosit biasanya diamati dengan metode imaging. Salah satu alat yang dapat mengidentifikasi terjadinya peristiwa osilasi kalsium adalah *laser fluorescence microscopy* yang memanfaatkan fenomena *Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)* dimana proses ini mengamati interaksi

antara dua molekul yang dilabeli (Berney, 2003).

Intraseluler kalsium dapat diamati dengan menggunakan probe Fluo-3 atau indo-1 atau fura-2 (Carrol, 1994). Fluo-3 adalah salah satu indikator  $\text{Ca}^{2+}$  yang paling cocok untuk CLSM dan flow cytometry. Puncak panjang gelombang tertinggi absorpsi dan emisi Fluo-3 masing-masing sebesar 506 dan 526 nm. Puncak absorpsi dan emisi dapat dinaikkan dengan menggunakan laser argon – ion pada 488 nm, dan fluoresensi yang dipancarkan (pada panjang gelombang  $>500$  nm) meningkat dengan meningkatnya  $[\text{Ca}^{2+}]$ . Fluo-3 dapat mengalami peningkatan 40 – 200 kali lipat fluoresensi setelah mengikat kalsium. Karena rentang peningkatan kalsium dalam banyak sel setelah terjadi stimulasi pada umumnya 5 – 10 kali lipat, maka Fluo-3 merupakan probe yang baik untuk digunakan dengan sensitivitas yang tinggi (Takashi, 1999).

Pada mikroskop ini digunakan 3 jenis sumber laser yang dapat diatur intensitas eksitasinya. Dan belum ada penelitian yang menunjukkan pentingnya intensitas eksitasi terhadap intensitas emisi yang dihasilkan dalam pengamatan (khususnya pengamatan imaging dengan menggunakan mikroskop ini).

Berdasarkan uraian tersebut maka dilakukan penelitian ini untuk mengetahui efek dari perubahan prosentase laser- laser untuk mengeksitasi Kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) terhadap emisi yang keluar.

## METODOLOGI PENELITIAN

Pengamatan osilasi kalsium pada sel hidup dilakukan dengan menggunakan bantuan alat confocal laser scanning microscope yang bekerja dengan metode fluorescence yang dalam hal ini mengkaji energy transfer. Sel hidup dapat berfluoresensi jika ada probes dan stimulus. Pada microscope ini stimulus berupa laser. Karena laser memiliki peranan penting pada penelitian ini diperlukan studi yang lebih lanjut tentang bagaimana pengaruh dirubahnya prosentase laser – laser dari beberapa jenis laser pada program CLSM ini.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Olympus Fluoview FV 1000 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM) Filter Version Scan Unit Olympus IX81 dengan perangkat komputer, dan laser Argon 488 nm, Laser HeNe Green 543 nm, Laser HeNe Red 633 nm. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah oosit muda yang diambil dari kambing potong yang berasal dari Rumah Potong Hewan (RPH), calcium indicator yang berupa Fluo-3.

Pada tahap awal dilakukan persiapan bahan. Bahan yang didapat dari rumah potong hewan (RPH) dibersihkan dan kemudian dimasukkan toples yang berisi NaCl steril dan antibiotik. Setelah oosit dikoleksi, diseleksi dan ditetesi probes Fluo-3 dalam keadaan gelap, oosit diamati menggunakan CLSM.

Tahap selanjutnya adalah pengaturan alat dan program yang menampilkan hasil imaging mikroskop. Dalam hal ini dipilih filter yang akan digunakan, filter yang digunakan pada penelitian ini :

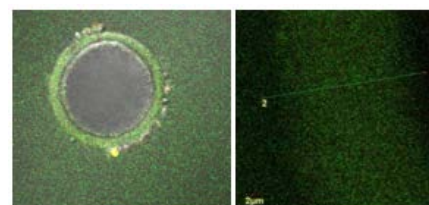
1. Filter Calcium Green2 (536 nm)
2. Filter Cy 3,5 (594 nm)
3. Filter Cy 5 (666 nm)

Dan laser yang digunakan dalam penelitian ini adalah laser 488nm, 543nm, dan 633nm. Setelah pengaturan selesai maka bahan diamati melalui mikroskop.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

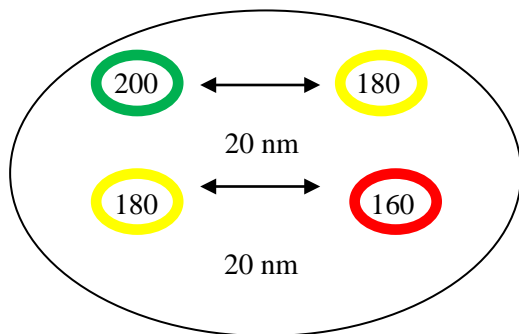
### A. Hasil Identifikasi FRET

Reaksi probe Fluo-3 dengan kalsium dalam oosit sehingga menghasilkan pemendaran, sebagaimana yang ditampilkan dalam gambar.

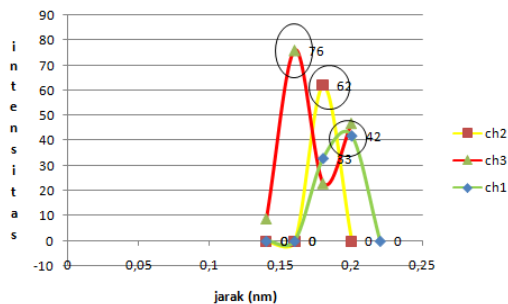


**Gambar 1.** Hasil pemendaran kalsium dalam oosit dengan probe Fluo-3

Hasil pemotongan pada spesimen ini kemudian di konversikan ke dalam bentuk grafik intensitas. Namun intensitas hasil fluoresensi terlalu berhimpit dan sulit untuk diidentifikasi, sehingga data intensitas tersebut diubah ke dalam bentuk excel untuk mempermudah pengidentifikasian transfer energi (FRET) dengan jarak yang lebih dekat. Dari data excel tersebut diseleksi kemungkinan terjadinya transfer energi (FRET) dari hijau ke kuning atau kuning ke merah dengan jarak 10 nm – 40 nm. Data yang berbentuk excel (Gambar 2) dianalisa dalam bentuk grafik (Gambar 3).



**Gambar 2.** Gambar dalam bentuk Excel



**Gambar 3.** Gambar dalam bentuk grafik

## B. Hasil Identifikasi Perubahan Persentase Laser

Kemudian terjadi transfer energi ke Fluo-3 sehingga mengakibatkan terjadinya FRET pada Fluo-3 berwarna hijau yang ditangkap filter, sisa energi lainnya ditransferkan ke sel telur. Pada sel telur akan mengalami eksitasi dan tereksitasi kembali yang nantinya akan ditangkap filter. Transfer energi yang terdeteksi setelah masuk ke filter menghasilkan transfer energi hijau ke kuning sebesar 2 dan transfer energi kuning ke hijau 7.

**Tabel 1. Hasil data penelitian**

no	prosentase (%) 488,543,633(nm)	transfer energi	
		Hijau ke Kuning	Kuning ke Merah
1	60, 0, 0	2	7
2	60, 10, 0	22	3
3	50, 50, 0	16	1
4	50, 35, 15	17	4
5	50, 15, 35	13	8
6	40, 8, 8	15	9
7	10, 60, 0	11	4
8	0, 60, 0	11	0
9	0,60, 10	9	3
10	0, 50 ,50	11	3
11	15, 50, 35	14	4
12	35, 50, 15	23	7
13	8, 40, 8	11	4
14	0, 10,60	3	3
15	0, 0, 60	4	2
16	10, 0, 60	9	3
17	50, 0, 50	16	6
18	15, 35, 50	15	1
19	35, 15, 50	14	4
20	8,8,40	9	4
21	60, 0, 10	8	7

Pada tabel 1 no 8 saat prosentase maksimal diberikan pada laser HeNe 543 nm didapatkan transfer energi hijau ke kuning sebanyak 11 dan tidak terdeteksi pada kuning ke merah. Sedangkan saat laser maksimal yang dinyalakan laser HeNe Red 633 nm didapatkan transfer energi hijau ke kuning 6 dan kuning ke merah sebanyak 4.

Dari data yang didapatkan terlihat bahwa transfer energi tetap terjadi meskipun sumber laser yang diberikan hanya salah satu laser saja. Hal ini dikarenakan energi yang dibawa laser terserap oleh atom-atom pada kalsium dan ditransferkan ke atom lainnya secara non radiatif.

## KESIMPULAN

Meskipun data yang diperoleh random karena letak kalsium yang acak di dalam oosit

sehingga tidak dapat diprediksi letak terjadinya transfer energi, tetapi pada penelitian ini daerah bagian sel yang digunakan dipusatkan pada daerah membran pelusida. Syarat terjadinya transfer energi yaitu jarak antara donor dan acceptor harus dengan jarak terdekat dan grafik spektrum donor dan acceptor harus overlap dengan jarak yang dekat pula, dan memiliki range yang lebar. Hasil identifikasi transfer energi paling banyak yang mendominasi adalah pasangan prosentase saat ketiga laser dinyalakan, dan dapat disimpulkan bahwa nilai prosentase (intensitas) pada setiap laser (sebagai sumber eksitasi) tidak mempengaruhi terjadinya transfer energi (FRET), tetapi besarnya energi yang dibawa oleh sumber eksitasi dapat mempengaruhi banyak atau sedikit terjadinya peristiwa transfer energi (FRET) dalam oosit.

Electroactivation. *Development Biology*(115): 947-956.  
Takashi, a., dkk. 1999. Measurement of Intracellular Calcium.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Bapak Ir.DJ Djoko HS, Mphil.,Ph.D dan Bapak Drs. Unggul P. Juswono, M.Sc di Jurusan Fisika, serta Bapak Hari Soepriandono S.Si., M.Si. di Jurusan Biologi Fakultas Mipa, Universitas Brawijaya yang telah membantu penulis dalam membimbing selama penelitian hingga terselesainya penulisan jurnal.

## DAFTAR PUSTAKA

- Berney, C. a. G. D. 2003. FRET or no FRET: A quantitative comparison. *Biophysical* 84 (6): 3992.
- Carrol, J., k. swann, et al. . 1994. Spatiotemporal dynamics of intracellular [Ca<sup>2+</sup>]i oscillations during the growth and meiotic maturation oocytes. *Great Britain The Company of Biologists* 120: 3507-3517.
- Ismudiono. 2010. Fisiologi dan Reproduksi Pada Ternak. Surabaya.
- Sun, F. Z., J. Hoyland, X. Huang, W. Mason dan R.M. Moor. 1992. A Comparison of Intracellular Changes in Porcine Eggs After Fertilization and